



# 4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 197 46 874.8

**Anmeldetag:** 23. Oktober 1997

**Anmelder/Inhaber:** QIAGEN GmbH, Hilden/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen – insbesondere unter Verwendung hydrophober Membranen

**IPC:** C 07 H und G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. April 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Seiler

## Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren unter Verwendung hydrophober Oberflächen insbesondere unter Verwendung hydrophober Membranen.



## **Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen - insbesondere unter Verwendung hydrophober Membranen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen unter Verwendung hydrophober Membranen oder Membranen mit hydrophobisierter Oberfläche.

Die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen und klinischen Probenmaterialien ist von essentieller Bedeutung für Arbeitsbereiche, in denen Nukleinsäure-basierende Arbeitstechniken angewendet werden und in die Nukleinsäure-basierende Techniken gerade Einzug halten. Hierzu zählen zum Beispiel die Vaterschaftsanalyse, Gewebetypisierungen, Identifizierung von Erbkrankheiten, Genomanalyse, molekulare Diagnostik, Bestimmung von Infektionskrankheiten, Tier- und Pflanzenzucht, transgene Forschung, Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Biologie und der Medizin sowie zahlreiche verwandte Arbeitsgebiete. Dabei besteht eine generelle Schwierigkeit darin, biologische bzw. klinische Probenmaterialien so aufzubereiten, daß die in ihr enthaltenen Nukleinsäuren direkt in die jeweilige Analysenmethode eingesetzt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind bereits zahlreiche Verfahren zur Reinigung von DNA bekannt. So ist es bekannt, Plasmid-DNA beispielsweise zum Zwecke des Klonierens oder auch für andere experimentelle Vorhaben nach dem Verfahren von Birnboim [Methods in Enzymology 100 (1983) 243] zu reinigen. Nach diesem Verfahren wird ein geklärtes Lysat bakteriellen Ursprungs einem Caesiumchlorid Gradienten ausgesetzt und über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden zentrifugiert. Diesem Verfahrensschritt folgt gewöhnlicherweise die Extraktion und die Praezipitation der DNA. Dieses Verfahren ist mit dem Nachteil verbunden, daß zum es einen apparativ sehr aufwendig und auf der anderen Seite sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und nicht automatisierbar ist.

Andere Methoden, bei denen geklärte Lysate eingesetzt werden um DNA zu isolieren bestehen in der Ionenaustauschchromatographie [Colpan et al., J. Chromatog. 296 (1984) 339] und in der Gelfiltrationsmethode. [Moreau et al. Analyt. Biochem. 166 (1987) 188]. Diese Verfahren bieten sich in erster Linie als Ersatz für den Caesiumchlorid-Gradienten an, machen aber ein aufwendiges System für die Lösungsmittelversorgung sowie die Praezipitation

der so gewonnenen DNA-Fraktionen erforderlich, da sie gewöhnlicherweise Salze enthalten und sehr verdünnte Lösungen darstellen.

Marko et al. [Analyt. Biochem. 121 (1982) 382] sowie Vogelstein et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615] erkannten, daß, falls die DNA aus Nukleinsäure-enthaltenden Extrakten hohen Konzentrationen von Natriumiodid oder Natriumperchlorat ausgesetzt wird, die DNA allein nur an mechanisch fein zerkleinerten Glass-Scintillationsröhrchen sowie zerkleinerten Glasfasermembranen bzw. Glasfaserplatten bindet, während RNA und Proteine nicht binden. Die so gebundene DNA kann ggf. mit Wasser eluiert werden.

Aus den verschiedenen Lehren, die im Stand der Technik offenbart sind, geht ferner ganz allgemein hervor, daß alle Nukleinsäurereinigungsverfahren, die auf dem Prinzip der Festphasenextraktion beruhen, auf die Verwendung von hydrophilen Oberflächen zurückgreifen - wie modifizierte Silica-Materialien - (beispielsweise DEAE-Anionenaustauscherchromatographie, Silica-Membranen oder Silica-Partikel).

Im Stand der Technik wird im allgemeinen darauf hingewiesen, daß die Oberflächen unbedingt einen hydrophilen Charakter aufweisen müssen - wie dies z.B. bei Silicagel der Fall ist - um für die Immobilisierung von Nukleinsäuren tauglich zu sein. Dagegen findet sich im Stand der Technik lediglich ein Hinweis auf die Verwendung hydrophober Oberflächen.

So wird in der WO-A-87/06621 die Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer PVDF-Membran beschrieben. Allerdings werden die an die PVDF-Membran gebundenen Nukleinsäuren anschließend nicht eluiert, sondern die Membran wird samt gebundener Nukleinsäuren direkt in einen PCR-Ansatz eingebracht. Letztendlich wird in dieser internationalen Patentanmeldung und in der weiteren Literatur jedoch die Lehre offenbart, daß hydrophobe Oberflächen bzw. Membranen im allgemeinen zuvor mit Wasser oder Alkohol benetzt werden müssen, um die Nukleinsäuren in halbwegs befriedigenden Ausbeuten immobilisieren zu können.

Für eine Reihe von modernen Applikationen - wie z.B. der PCR-, der Reversed-Transcription-PCR, SunRise, LCX- branched-DNA, NASBA, oder TaqMan-Technologie und ähnlichen Echtzeitquantifizierungsverfahren für PCR - ist es auf der anderen Seite jedoch absolut notwendig, die Nukleinsäuren direkt von der festen Phase lösen zu können. Hierzu ist der WO-A-87/06621 diejenige

Lehre zu entnehmen, daß die Nukleinsäure zwar von den dort eingesetzten Membranen wiedergewonnen werden kann, daß diese Wiedergewinnung jedoch sehr problematisch ist und bei weitem nicht zur quantitativen Isolierung von Nukleinsäuren geeignet ist. Daneben fallen die so gewonnenen Nukleinsäuren in vergleichsweise sehr hoher Verdünnung an - ein Umstand, der weitere Folgeschritte zwecks Konzentrierung und Isolierung zwangsläufig erforderlich macht.

Aus den oben genannten Gründen stellen die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren - insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung des Verfahrensablaufs zur Nukleinsäuregewinnung - keinen geeigneten Ausgangspunkt für eine verfahrenstechnisch möglichst einfache und quantitative Isolierung von Nukleinsäuren dar.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren zu überwinden und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches dazu geeignet ist, ohne erheblichen technischen Mehraufwand weitgehend vollautomatisch durchgeführt werden zu können.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht insbesondere darin, Nukleinsäuren an eine immobile Phase - insbesondere an eine Membran in der Art und Weise zu binden, daß sie in einem folgenden Reaktionsschritt ohne weiteres wieder von dieser Phase abgelöst werden kann und ggf. in weiteren Anwendungen - wie z.B. Restriktionsverdauung, RT, PCR, RT-PCR oder beispielsweise auch NASBA oder in jedweder anderen oben genannten geeigneten Analyse- bzw. Enzymreaktion eingesetzt werden können.

Gelöst werden die vorgenannten Aufgaben erfindungsgemäß durch die Verwendung von porösen hydrophoben Membranen, an welche die Nukleinsäuren auf einfache Weise aus der die Nukleinsäuren enthaltenden Probe gebunden und mittels ebenso einfacher Verfahrensschritte wieder abgelöst werden können, wobei es die erfindungsgemäß einfache Prozeßführung ermöglicht, das Verfahren insbesondere vollautomatisch durchführen zu können.

Dabei wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure enthaltende Probe durch eine Probe bzw. Probenansatz definiert, die bzw. der Nukleinsäuren enthält, die als geeignete Edukte für in vitro Transskriptionen,

PCR-Reaktionen, NASBA-Reaktionen oder cDNA-Synthesen dienen können - wie z.B. : Plasma, Körperflüssigkeiten - wie beispielsweise Blut, Sputum, Urin, Faeces -, Zellen, Serum, Abstriche, Gewebeproben jeder Art, Pflanzen und Pflanzenteile, Bakterien, Viren, Hefen etc., wie beispielsweise sie in der Europäischen Patentanmeldung Nr.: 95909684.3 offenbart sind, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird - oder auch freie Nukleinsäuren

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nimmt man die oben beschriebene Nukleinsäuren enthaltende Probe in einer Lösung auf, die geeignete Salze und/oder Alkohol(e) enthält, anschließend ggf. den Ansatz aufschließt und mischt und die so erhaltene Mischung mittels eines Vakuums, auf dem Wege einer Zentrifugation, mittels Überdruck oder durch Kapillarkräfte über eine hydrophobe Membran führt.

Als Salze für das Immobilisieren von Nukleinsäuren an hydrophoben Membranen kommen Salze von Alkali- oder Erdalkalimetallen mit Mineralsäuren in Frage; insbesondere Alkali- oder Erdalkalihalogenide bzw. -sulfate worunter die Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat besonders bevorzugt werden.

Ferner sind zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Salze von ein- oder mehrbasischen oder auch polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkali- oder Erdalkalimetallen geeignet. Darunter fallen insbesondere Salze des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren - wie z.B. Oxal-, Malon- oder Bernsteinsäure - oder mit Hydroxy- bzw. Polyhydroxycarbonsäuren - wie z.B. bevorzugterweise mit Zitronensäure.

Als besonders zweckmäßig hat sich dabei der Einsatz von sog. chaotropen Agenzien herausgestellt. Chaotrope Substanzen sind in der Lage die dreidimensionale Struktur der Wasserstoffbrückenbindung zu stören. Hierdurch werden - wie allgemein bekannt ist - auch die intramolekularen Bindungskräfte geschwächt, die bei der Ausbildung der räumlichen Strukturen - wie z.B. Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstrukturen - bei biologischen Molekülen beteiligt sind. Derartige chaotrope Agenzien sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt [Römpp, Lexikon der Biotechnologie, Herausgeber. H. Dellweg, R.D. Schmid u. W.E. Fromm, Thieme Verlag, Stuttgart 1992].

Als bevorzugte chaotrope Substanzen gelten gemäß der vorliegenden Erfindung beispielsweise Salze aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid und Harnstoff.

Die chaotropen Substanzen werden dabei in 0.01 bis 10 molarer wässriger Lösung, bevorzugt in 0.1 bis 7 molarer wässriger Lösung und besonders bevorzugt in 0.2 bis 5 molarer wässriger Lösung eingesetzt. Hierbei können die vorbezeichneten chaotropen Agenzien allein oder in Kombinationen verwandt werden. Insbesondere werden - insbesondere werden 0.01 bis 10 molare wässrige Lösungen, bevorzugt 0.1 bis 7 molare wässrige Lösungen und besonders bevorzugt in 0.2 bis 5 molare wässrige Lösungen von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-/iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid eingesetzt.

Als Alkohole kommen für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst alle Hydroxyderivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen in Betracht. Dabei ist es zunächst unerheblich ob diese Verbindung eine, zwei, drei oder mehr Hydroxylgruppen - wie mehrwertige C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole, beispielsweise Ethylenglykol, Propylenglykol oder Glycerin - enthalten.

Daneben zählen ebenfalls die Zuckerabkömmlinge - die sog. Aldite - wie auch die Phenole - beispielsweise Polyphenole - zu den erfindungsgemäß einsetzbaren Alkoholen.

Unter den vorgenannten Hydroxyverbindungen werden die C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole - wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, *tert.*-Butanol und die Pentanole besonders bevorzugt.

Als hydrophob gelten im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Stoffe bzw. Membranen, die von ihrem chemischen Charakter her nicht in Wasser eindringen - bzw. vice versa - darin bleiben zu vermögen.

Unter hydrophober Oberfläche - vorzugsweise Membran - wird im Sinne der vorliegenden Erfindung jede mikroporöse Trennschicht verstanden, die einen hydrophoben Charakter aufweist. Im Falle einer Membran wird die hydrophobe Oberfläche durch eine Folie aus einem polymeren Material gebildet, wobei das Polymer vorzugsweise polare Gruppen, wie z.B. Ester- bzw. Carbonyl- oder Amid-Gruppen aufweist. Auf der anderen Seite ist es denkbar, die polaren

Gruppe mit der Auftragung des Hydrophobierungsmittels auf eine Oberfläche aufzubringen, die per se keine polaren Gruppen aufweist, falls dies gewünscht ist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt der Begriff Oberfläche im weiteren Sinne auch eine Schicht von Partikeln bzw. auch ein Granulat sowie auch Fasern mit hydrophoben Eigenschaften, die aus den ursprünglich die Membranen aufbauenden Materialien bestehen.

Als bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung gelten Membranen, die aus einem hydrophilen Grundmaterial bestehen und die durch eine entsprechende chemische Nachbehandlung, die an sich aus dem Stand der Technik bekannt ist - hydrophobisiert wurden, wie z.B. hydrophobisierte Nylon-Membranen, die kommerziell erhältlich sind.

Unter hydrophobisierten Membranen werden erfindungsgemäß allgemein solche Membranen verstanden, die als unter Umständen ursprünglich hydrophile Membran mit dem unten erwähnten Hydrophobiermitteln überzogen wurden. Derartige Hydrophobiermittel überziehen hydrophile Substanzen mit einer dünnen Schicht hydrophober Gruppen, wozu beispielsweise längere Alkylketten oder Siloxangruppen gehören. Geeignete Hydrophobiermittel sind aus dem Stand der Technik in großer Zahl bekannt und stellen erfindungsgemäß Paraffine, Wachse, Metallseifen etc. ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartäre organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierte Melaminharze, Silicone, zinkorganische Verbindungen Glutardialdehyde und ähnliche Verbindungen dar.

Daneben gelten als erfindungsgemäß einsetzbare hydrophobe Membranen, solche Membranen, die hydrophobisiert sind und deren Grundmaterial polare Gruppen aufweisen kann. Gemäß dieser Kriterien eignen sich beispielsweise - insbesondere hydrophobisierte - Materialien aus der folgenden Gruppe für den erfindungsgemäßen Einsatz:

Nylon, Polysulfone, Polyethersulfone, Polycarbonate, Polyacrylate sowie Acrylsäurecopolymere, Polyurethane, Polyamide, Polyvinylchlorid, Fluorocarbonate, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylendifluorid, Ethylentetrafluoroethylen, Polyethylenchlorotrifluoroethyl n-Copolymerisate oder Polyphenylensulfid sowie Cellulose und Cellulose-Mischester oder



Nitro-cellulosen wie auch hydrophobisierte Glasfasermembranen, worunter hydrophobisierte Nylon-Membrane besonders bevorzugt sind,

Die Membranen, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, haben dabei beispielsweise einen Porendurchmesser von 0.05 bis 20  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 0.2 bis  $\mu\text{m}$  und besonders bevorzugt 0.45 bis 5.0  $\mu\text{m}$ .

Als Waschpuffer kommen ebenfalls die oben beschriebenen Salze oder Alkohole bzw. Phenole oder Polyphenole in Frage. Die Temperaturen liegen im Waschschritt üblicherweise in einem Intervall von 10 bis 30 °C, wobei auch höhere Temperaturen erfolgreich angewandt werden können

Zur Elution der gebundenen Nukleinsäure eignen sich erfindungsgemäß Wasser oder wässrige Salzlösungen als Elutionsmittel. Als Salzlösungen werden Pufferlösungen eingesetzt, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) in einer Konzentration von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter, bevorzugt 0.01 bis 0.2 Mol/Liter, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare Lösungen. Daneben werden bevorzugt wässrige Lösungen von Alkali- oder Erdalkalimetallsalzen - insbesondere deren Halogenide - eingesetzt, worunter 0.001 bis 0.5 - bevorzugt 0.01 bis 0.2 molare, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare wässrige Lösungen von Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid oder Magnesiumdichlorid. Daneben können bevorzugt auch Lösungen von Salzen der Alkalimetalle oder Erdalkalimetalle mit Carbon- oder Dicarbonsäuren - Oxalsäure oder Essigsäure - in dem zuvor genannten Konzentrationsbereich eingesetzt werden, wie z.B 0.001 bis 0.5 molare - bevorzugt 0.01 bis 0.2 molare, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare Lösungen von Natriumacetat oder -oxalat in Wasser.

Ganz besonders wird Wasser als Elutionsmittel bevorzugt.

Die Elution kann erfindungsgemäß mittels Überdruck, Vakuum, Zentrifugation oder durch Kapillarkräfte erfolgen.

Hinsichtlich der einzelnen Schritte wird das erfindungsgemäße Verfahren wie folgt durchgeführt:

Das Lysat der zur Gewinnung der Nukleinsäuren dienenden Probe oder die ursprünglich freie(n) Nukleinsäure(n) wird/werden beispielsweise in eine (Plastik-)Säule pipettiert, in der - beispielsweise auf dem Boden - die hydrophobe Membran fixiert wird. Zweckmäßigerweise kann die Membran auf einer Fritte fixiert werden, die als mechanische Unterstützung dient. Anschließend wird das Lysat durch die Membran geführt, was durch Anlegen eines Vakuums am Ausgang der Säule erreicht werden kann. Auf der anderen Seite kann der Transport durch einen Lysat-seitigen Überdruck erfolgen. Daneben kann - wie schon zuvor erwähnt - der Lysattransport auf dem Wege der Zentrifugation oder durch die Einwirkung von Kapillarkräften bewerkstelligt werden; letzteres kann zum Beispiel mit einem schwammartigen Material geschehen, das unterhalb der Membran mit dem Lysat bzw. Filtrat in Kontakt gebracht wird.

Der Vorteil einer derartigen Anordnung besteht in einer einfachen, sicheren und bequemen Möglichkeit der Filtrat-Entsorgung - es muß in diesem Fall nur der Schwamm, der nunmehr mit dem Filtrat mehr oder weniger vollgesogen ist, ausgetauscht werden. Es wird an dieser Stelle deutlich, daß die Säule kontinuierlich oder auch batch-weise betrieben werden kann und, daß beide Betriebsarten vollautomatisiert durchgeführt werden können, bis die hydrophobe Membran mit Nukleinsäure gesättigt ist. Im letzten Schritt erfolgt die Elution der Nukleinsäure, welche beispielsweise von der Membran abpipettiert bzw. abgehebert oder auch durch die Membran oder durch die oben erwähnte Schicht aus Partikeln, Granulat oder Fasern aus hydrophoben Membranmaterialien durchgesogen, druchgedrückt oder durchzentrifugiert werden kann.

Das Auffangen von Fraktionen, welche in großer Verdünnung die gewünschten Nukleinsäuren enthalten und eine anschließende Konzentrierung erfordern, entfallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren völlig - vielmehr fallen die gewünschten Nukleinsäuren in schwach oder nicht-salzhaltigen Lösungen in sehr kleinen Volumina an, was von großem Vorteil für alle molekularbiologischen Analyseverfahren ist, da hier gewünscht ist, reine Nukleinsäuren in möglichst kleinen Volumina bei gleichzeitig hoher Konzentration einzusetzen.

Daneben kann auch der letzte Verfahrensschritt - wie auch die Vorbereitung der erfindungsgemäßen Membran bzw. der Säule für die nächste Nukleinsäureisolation - leicht vollautomatisiert erfolgen, da die

abschließend eluierten Nukleinsäuren von oben von der Membran abgesaugt bzw. abpipettiert werden können.

Ferner bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß das über der Membran befindliche Volumen als Reaktionsraum genutzt werden kann. So ist es z.B. möglich, nach dem Isolieren und Eluieren der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Nukleinsäuren, diese einer molekularbiologischen Applikation - wie Restriktionsverdauung, RT, PCR, RT-PCR, NASBA oder Enzymreaktionen - zu unterwerfen, die aus diesen Reaktionen hervorgehenden Nukleinsäuren gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erneut an die hydrophobe bzw. hydrophobisierte Membran zu binden, wie beschreiben zu waschen und anschließend zu eluieren, zu isolieren, bzw. zu analysieren, beispielsweise mittels Spektroskopie, Fluorometrie oder ähnlichen Meßverfahren.

Die vorbeschriebene Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert. Verschiedenartige, andere Ausgestaltungen der Verfahren werden für den Fachmann aus der vorstehenden Beschreibung und den Beispielen ersichtlich. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Beispiele und die diesen zugeordnete Beschreibung lediglich zum Zweck der Erläuterung vorgesehen und nicht als Einschränkung der Erfindung anzusehen sind.

### Beispiel 1

#### Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

In einer Plastiksäule werden kommerziell erhältliche hydrophobe Nylon-Membranen (Beispielsweise ein Material der Fa. MSI: Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2  $\mu\text{m}$  oder ein Material der Fa. Pall GmbH: Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2  $\mu\text{m}$ ), die durch chemische Nachbehandlung hydrophobisiert wurden, einlagig eingebracht. Die Membranen werden auf einer Polypropylenfritte, die als mechanische Unterstützung dient, plziert. Die Membranen werden in der Plastiksäule durch einen Spannring fixiert.

Die so vorbereitete Säule wird über eine Luerverbindung mit einer Vakuumkammer verbunden - alle Isolierungsschritte werden mit Hilfe eines angelegten Vakuums durchgeführt.

Zur Isolierung werden  $5 \times 10^5$  H La-Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen werden durch Zugabe von 150  $\mu$ l eines handelsüblichen Guanidinium-iso-thiocyanat-Puffer - wie z.B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen - auf an sich aus dem Stand der Technik bekannte Weise lysiert. Dabei wird die Lyse durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s unterstützt. Anschließend werden 150  $\mu$ l 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren oder durch vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt.

Das Lysat wird anschließend in die Plastiksäule pipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den so eingestellten Bedingungen bleibt die RNA an der Membran gebunden. Anschließend wird mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-iso-thiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Fa. Qiagen - und danach mit einem zweiten Tris-haltigen bzw. TRIS- und alkohol-haltigen Waschpuffer - z.B. mit dem Puffer RPE der Fa. Qiagen - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Nach dem letzten Waschschrift wird das Vakuum über einen Zeitraum von ca. 10 min aufrechterhalten, um die Membran zu trocknen. danach wird die Vakuumkammer belüftet.

Zur Elution werden 70  $\mu$ l RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Nach einer Inkubation über einen Zeitraum von 1 min bei einer Temperatur im Bereich von 10 bis 30 °C wird das Eluat mittels einer Pipette von oben von der Membran abpipettiert und der Elutionsschritt wird zum Zweck einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt (vgl. Fig. 1: Total-RNA über Hydrolon 1.2 isoliert)

Die Ergebnisse der zwei Isolierungen mit hydrophoben Nylonmembranen (Nr. 1 und 2) sind in der nachfolgenden Tabelle 1 Vergleichsversuche, in denen zum einen hydrophiles Nylon (Nyaflo) (Nr. 3) sowie eine Silica-Membran eingesetzt wurde (Nr. 4), gegenübergestellt. Die dort wiedergegebenen Werte liefern einen überzeugenden Beleg für die beeindruckende Isolierungsleistung sowie Trennwirkung der erfindungsgemäß eingesetzten hydrophoben Materialien.

**Tabelle 1:** RNA-Ausbeute und -Reinheit der nach Beispiel 1 isolierten Total-RNA

Nr	Membrantypus	Ausbeute an Gesamt- RNA [µg]	E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub>
1	Magna SH 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	6,0	1,97
2	Hydrolon 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	7,1	2,05
3	Nyaflo (hydrophiles Nylon)	< 0,2	nicht bestimmt
4	Hydrophile Silica-Membran	< 0,2	nicht bestimmt

Die isolierte RNA kann ferner auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert werden. Hierzu werden beispielsweise 1,2 %-ige Formaldehyd-Agarose-Gele angefertigt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 wiedergegeben.

In Fig. 2 verkörpert Spur 1 eine Total RNA, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

Spur 2 stellt eine Total RNA dar, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

Spur 3 stellt das Chromatogramm einer Total RNA dar, die über eine Silica-Membran isoliert wurde.

Dabei wurden jeweils 50 µl der Total-RNA Isolate analysiert.

Fig. 2 liefert einen deutlichen Beleg dafür, daß unter Verwendung der Silica-Membran kein meßbarer Anteil an Total-RNA isoliert werden kann.

## Beispiel 2

### Isolierung von Gesamt -RNA aus Mausleber

Bei diesem Beispiel werden Lysat und Waschlösungen mittels Zentrifugation über die hydrophobe Membran geführt und die RNA durch Abnehmen des Überstandes von oben eluiert.

5 mg bei -80 °C tiefgefrorene Mausleber werden in ein mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-iso-thiocyanat enthaltenden Lysepuffers (beispielsweise Puffer RLT der Fa. Qiagen) gefülltes 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mittels eines elektrischen Homogenisators über einen Zeitraum von 30 s homogenisiert. Anschließend werden 350 µl 70 %-iges Ethanol zu dem Lysat gegeben und durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von 5 s gemischt. Drei derartige Lysate werden anschließend jeweils in eine Plastiksäulen enthaltend eine hydrophobe Nylon-Membran vom Typ Magna SH 1.2 µm, eine hydrophobe Nylon-Membran vom Typ Hydrolon und - als Vergleichsversuch - Glasfasermembran (hydrophiles Silica), die sich in einem 2ml Auffanggefäß befinden, pipettiert. Das Lysat wurde jeweils durch Zentrifugation über einen Zeitraum von 15 s bei 10.000 x g durch die Membran geführt, wobei die RNA gemäß den in Tabelle 2 wiedergegebenen Werten an den Membranen haften blieb.

Der Durchbruch wird jeweils verworfen und die Säule erneut im Auffanggefäß platziert. Anschließend werden die Membranen einmal mit einem kommerziell erhältlichen TRIS- und Ethanol-haltigen Waschpuffer (beispielsweise Puffer RW1 der Fa. Qiagen) gewaschen sowie zweimal mit einem weiteren kommerziell erhältlichen Guanidinium-iso-thiocyanat enthaltenden Waschpuffer (beispielsweise Puffer RPE der Fa. Qiagen) gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation durch die Membran geführt wird und der letzte Waschschrift bei 18.000 x g über einen Zeitraum von 2 min Zentrifugationszeit durchgeführt wird, um die Membran zu trocknen.

13

Zur Elution werden 70 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran zu lösen. Nach einer Inkubation über einen Zeitraum von einer Minute bei 10 - 30 °C werden die Eluate von oben - d.h.: vom Überstand auf der Membran mittels einer Pipette entnommen. Der Elutionsschritt wurde noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wurde durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. - Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung der Verhältnisse der Lichtabsorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt.

Tabelle 2: RNA-Ausbeute und -Reinheit der nach Beispiel 2 isolierten Gesamt-RNA

Nr	Membrantypus	Ausbeute an Gesamt- RNA [µg]	E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub>
1	Magna SH 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	15	1.92
2	Hydrolon 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	14	2,05
3	Glasfasermembran (hydrophiles Silica)	1.7	nicht bestimmt

### Beispiel 3

Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische. Bei diesem Beispiel werden Lysat und Waschlösungen durch Anlegen eines Vakuums über die hydrophobe Membran geführt.

In Plastiksäulen, die mit einer Vakuumkammer in Verbindung stehen, werden hydrophobe Nylon-Membranen (beispielsweise Hydrolon 1.2 mm der Fa. Pall) analog Beispiel 1 eingebracht.

100 µl einer Gesamt-RNA enthaltenden wässrigen Lösung werden jeweils mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-*iso*-thiocyanat enthaltenden Lysepuffers (beispielsweise Puffer RLT der Fa. Qiagen), 350 µl 1.2 M Natriumacetat-Lösung, 350 µl 2 M Natriumchlorid-Lösung, 350 µl 4 M Lithiumchlorid-Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend werden jeweils 250 µl Ethanol zugegeben und ebenfalls durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die RNA-haltigen Lösungen werden danach in die Plastiksäulen einpipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den beschriebenen Bedingungen bleibt die RNA an den Membranen gebunden. Die Membranen werden anschließend - wie in Beispiel 1 beschrieben - gewaschen.

Abschließend wird die RNA - ebenfalls wie in Beispiel 1 beschrieben - von oben - von der Membran mittels einer Pipette entnommen.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wurde durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. - Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung der Verhältnisse der Lichtabsorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt.

Tabelle 3: Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische

Nr	Salz/Alkohol-Gemisch	Ausbeute an Gesamt- RNA [µg]	E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub>
1	RLT-Puffer Qiagen	9.5	1.92
2	0.6 M Natriumacetat / 35 %-iges Ethanol	8.5	1.98
3	1.0 M Natriumchlorid / 35 %-iges Ethanol	7.9	1.90
4	2 M Lithiumchlorid / 35 %-iges Ethanol	4.0	2.01



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen, dadurch gekennzeichnet daß es folgende Schritte umfaßt:
  - Immobilisieren der Nukleinsäuren an einer hydrophoben Oberfläche
  - gegebenenfalls Waschen der immobilisierten Nukleinsäure mit einem Waschpuffer
  - Ablösen der immobilisierten Nukleinsäure von der Oberfläche
  - ggf. Eluieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Oberfläche eine Membran ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß hydrophobe Membran aus einem Polymer mit polaren Gruppen aufgebaut ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen der Alkali- oder Erdalkalimetalle mit Mineralsäuren eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Alkali- oder Erdalkalihalogenide oder -sulfate eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen von ein- oder mehrbasischen oder polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkali- oder Erdalkalimetallen eingesetzt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Dicarbonsäure Oxalsäure, Malonsäure und/oder Bernsteinsäure ist.
10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen des Natriums oder des Kaliums mit einer Hydroxy- oder Polyhydroxycarbonsäure eingesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Polyhydroxycarbonsäure Zitronensäure ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren ggf. zusätzlich chaotrope Agenzien eingesetzt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agens ein Salz aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid, Guanidin-iso-thiocyanat oder Hamstoff ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß 0.01 molare bis 10 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß 0.1 molare bis 7 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß 0.2 molare bis 5 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 - 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-*iso*-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Hydroxylderivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxylderivate C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole eingesetzt werden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkanole Methanol, Ethanol, n-Propanol, *tert.*-Butanol und/oder Pentanole eingesetzt werden.
21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxyderivat ein Aldit eingesetzt wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren ein Phenol oder Polyphenol eingesetzt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren von Nukleinsäuren hydrophile Membranen mit einer hydrophobisierten Oberfläche eingesetzt werden.
24. Verfahren nach einem Ansprüche 1 - 3, oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophile Oberfläche oder die Membran aus Nylon, einem Polysulfon, Polyethersulfon, Polycarbonat, Polyacrylat sowie einem Acrylsäurecopolymeren, Polyurethan, Polyamid, Polyvinylchlorid, Fluorocarbonat, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylendifluorid, Ethylentetrafluoroethylen, einem Polyethylenchlorotrifluoroethylen-Copolymerisat oder Polyphenylensulfid besteht.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß Oberfläche oder die Membran aus einem hydrophobisierten Nylon besteht.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 23 - 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran mit einem Hydrophobiermittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartären organische Verbindungen, Hamstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, Silicone, zinkorganischen Verbindungen und/oder mit Glutardialdehyd beschichtet ist.
27. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Waschen der immobilisierten Nukleinsäuren eine Salzlösung oder eine Pufferlösung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 22 eingesetzt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Elution der Nukleinsäure eine wässrige Salz- oder Pufferlösung eingesetzt wird.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung eine oder mehrere Substanz(en) aus der Gruppe Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) enthält.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter eingesetzt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.2 Mol/Liter eingesetzt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.05 Mol/Liter eingesetzt wird.
33. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung eines Alkalimetall- oder Erdalkalimetallhalogenids eingesetzt wird.
34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung von Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid oder Magnesiumdichlorid eingesetzt wird.

- 19
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter eingesetzt wird.
  36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich 0.01 bis 0.2 Mol/Liter eingesetzt wird.
  37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich 0.01 bis 0.05
  38. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung eines Salzes eines Alkalimetalls oder Erdalkalimetalls mit einer Carbon- oder Dicarbonsäuren eingesetzt wird.
  39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Carbonsäure Essigsäure und die Dicarbonsäure Oxalsäure ist.
  40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz Natriumacetat oder Natriumoxalat ist.
  41. Verfahren nach einem der Ansprüche 38, 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter vorliegt.
  42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.2 Mol/Liter, vorliegt.
  43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen Lösung in einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.05 Mol/Liter, vorliegt.
  44. Verfahren nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Elutionsmittel Wasser eingesetzt wird.

- 20
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran einen Porendurchmesser von 0,05 bis 20  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 0,2 bis  $\mu\text{m}$ , besonders bevorzugt 0,45 bis 5,0  $\mu\text{m}$  besitzt.
46. Verwendung einer Oberfläche oder einer Membran aus hydrophoben Material oder einem hydrophilen Material, dessen Oberfläche hydrophobisiert wurde, zur Isolierung von Nukleinsäuren.
47. Verwendung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche oder die Membran aus Nylon, Polysulfone, Polyethersulfone, Polycarbonate, Polyacrylate sowie Acrylsäurecopolymere, Polyurethane, Polyamide, Polyvinylchlorid, Fluorocarbonate, Polytetrafluoroethyl, Polyvinylendifluorid, Ethylen-co-tetrafluoroethylen, Polyethylenchlorodifluoroethylen-Copolymerisate oder Polyphenylensulfid besteht.
48. Verwendung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophobisierte Nylon-Membran ist.
49. Verwendung nach einem der Ansprüche 46 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche oder Membran eine hydrophile Oberfläche oder Membran ist, die mit einem Hydrophobiermittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartären organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, Silicone, zinkorganischen Verbindungen und/oder mit Glutardialdehyd überzogen ist.
50. Vorrichtung enthaltend eine hydrophobe Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eine Lösung zum Immobilisieren der Nukleinsäure und eine Waschlösung sowie ggf. eine Elutionslösung.

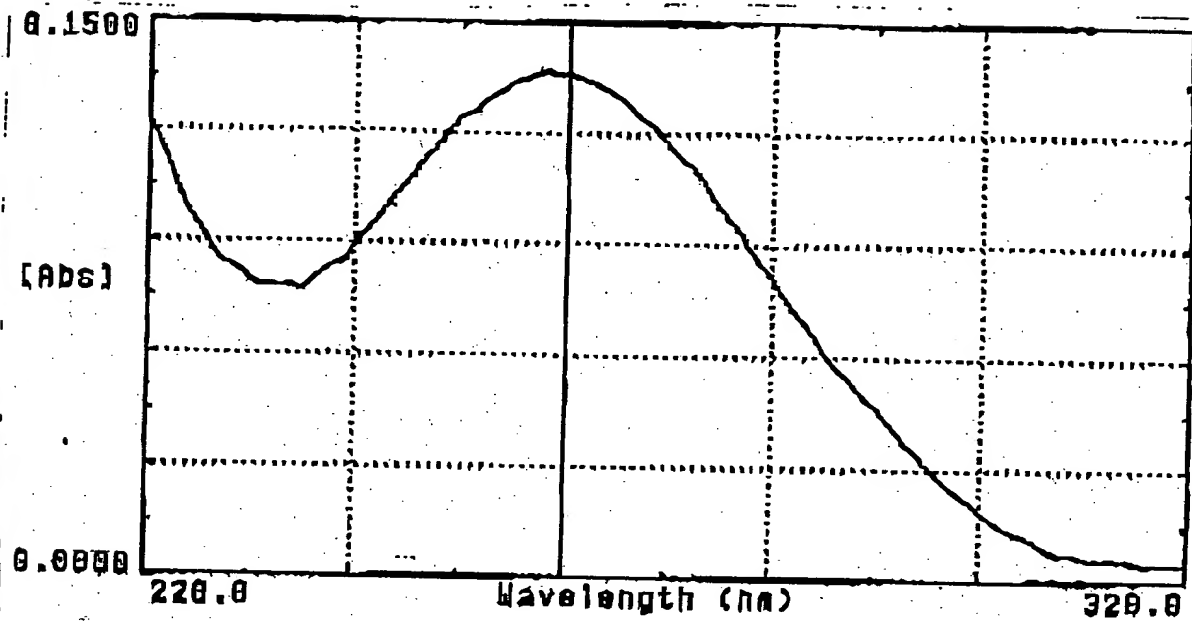


Fig. 1

1 2 3



Fig. 2



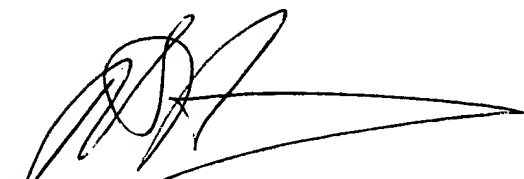
TRANSLATION  
INTERPRETATION  
A-V NARRATION  
MULTILINGUAL TYPESETTING  
LINGUISTIC CONSULTATION

295 Madison Avenue, 45th Floor, New York, NY 10017 Tel (212) 271-0401 Fax (212) 271-0404

TO WHOM IT MAY CONCERN:

I, Eleonore A. Speckens, President of EuroNet Language Services Inc., located at 295 Madison Avenue, 45th Floor, New York, New York 10017, have a thorough knowledge of the German and English languages and hereby certify that the attached patent application DE 19746874.8 in the English language is the true and accurate translation of the attached patent application DE 19746874.8 in the German language.

On this, the thirtieth day of November, 1999, New York, NY 10017

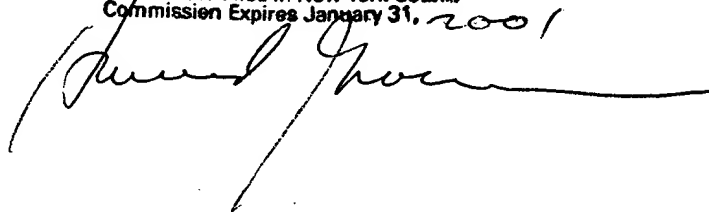


Eleonore A. Speckens

Sworn before me on this date

12/1/99

HOWARD GROSSMAN  
Notary Public, State of New York  
No. 31-6686486  
Qualified in New York County  
Certificate Filed in New York County  
Commission Expires January 31, 2001



**THE EUROPEAN SPECIALISTS**



GERMAN PATENT OFFICE  
German Patent Office - 80297 Munich

Munich, December 17, 1997  
Direct line: (089) 2195-4267

File No.: 197 46 874.8-44  
Your ref.: PA044-K-3007  
App. No.: 5461391  
QIAGEN GmbH

Qiagen GmbH  
Attn. Dr. Rainer Wessel  
4 Max-Vollmer-Strasse  
40724 Hilden

### Bibliography Report

IPC Hk1	CO7H 21/00		File No. 197 46 874 8-44
IPC Nk1	CO7H 1/06	CO7H 1/08	GO1N 33/50
	GO1N 30/00		
App.	10/23/1997		
Des.	Process for isolation and purification of nucleic acids on hydrophobic surfaces, in particular with the use of hydrophobic membranes.		
App. No.	5461391 QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE		
Inv.	Dr. Helge Bastian, 40597, Duesseldorf, DE; Simone Gauch, 40597 Duesseldorf, DE; Dr. Uwe Oelmueller, 40699 Erkrath, DE P		

The application will probably be published on April 29, 1999.

The technical preparations pursuant to Article 32 Section 4 PatG [Patent Law] were completed 8 weeks ago.

Publication of the disclosure document will be dispensed with only if, more than 8 weeks prior to the publication date given above, the application is withdrawn or rejected or is to be deemed withdrawn (Article 32 Section 4 PatG.).

Note:

No further requirements

Examining Office for Class CO7H

**Please give applicant and file number  
in all filings.**

[seal]

**Please observe the important  
instructions on the other side**

To the  
German Patent Office  
80297 Munich

GERMAN PATENT OFFICE  
Application for Issue of a  
Patent

(1) Correspondence from the German Patent Office  
should be addressed to:

File No. *(will be issued by German Patent Office)*

Qiagen GmbH  
Attn. Dr. Rainer Wessel  
4 Max-Volmer-Strasse  
40724 Hilden

RECEIVED  
Oct. 28, 1997  
QIAGEN GmbH

197 46 374.8

(2) Symbol of the applicant/representative (max. 20 characters)

PA044-K-3007

Telephone number of the applicant/representative

02103 892 301

Date

October 23, 1997

(3) The recipient in box (1) is the  
Applicant

(4) Applicant

Qiagen GmbH  
4 Max-Volmer-Strasse  
40724 Hilden

Representative

Received by telex  
23 pages -German Patent Office [initial]

(5) NA

(6) Designation of the invention *(if too long, use separate page in duplicate)*

Process for isolation and purification of nucleic acids on hydrophobic surfaces, in particular with the use of hydrophobic membranes.

(7) Other applications

Application for examination - Examination of the application (Article 44 Patent Law)  
Examination proceeding

(10) Fee payment in the amount of DM 520.00

Check is enclosed

(11) Annexes (Annexes 3-7 in triplicate)

Preliminary fax on 10/23/97

3. 1 summary (with figures, if necessary)

4. 14 pages of description

6. 6 pages of patent claims

50 patent claims 11/14/97 [signature] QIAGEN GmbH

4 Max-Volmer-Strasse

7. 1 sheet of figures

(12) Signature(s)

Dr. Metin Colpan (Manager)

Certificate of receipt

10/25/97

GERMAN PATENT OFFICE

Application for issue of a patent

(1) Correspondence from the German Patent Office  
should be addressed to:

Patent

File No. *(will be issued by German Patent Office)*

Qiagen GmbH

Attn. Dr. Rainer Wessel

4 Max-Volmer-Strasse

40724 Hilden

RECEIVED

Oct. 31, 1997

QIAGEN GmbH

197 46 374.8

Received - Patents & Licenses

Oct. 31, 1997 520.00

[initials]

(2) Symbol for the applicant/representative (max. 20 characters)

PA044-K-3007

Telephone number of the applicant/representative

02103 892 301

Date

October 23, 1997

(3) The recipient in box (1) is the  
Applicant

(4) Applicant

Qiagen GmbH

4 Max-Volmer-Strasse

40724 Hilden

Representative

Received by telex

23 pages -German Patent Office [initial]

(5) NA

(6) Designation of the invention *(if too long, use separate page in duplicate)*

Process for isolation and purification of nucleic acids on hydrophobic surfaces, in particular with the use of hydrophobic membranes.

(7) Other applications

Application for examination - Examination of the application (Article 44 Patent Law)

Examination proceeding - Examination process

(10) Fee payment in the amount of DM 520.00

Check is enclosed

This patent application was received at the German Patent Office on the date indicated by perforation. It received the File No. designated with "P". According to the provisions for applications, this file number must be given with all filings. When making payments, the purpose should be added.

[illegible stamp]

**Please observe the instructions on the backside  
of the copy of the application you retained.**

QIAGEN GmbH  
4 Max-Valmer-Strasse  
40724 Hilden  
Germany

Process for the isolation and purification of nucleic acids on hydrophobic surfaces - in particular, using hydrophobic membranes

This invention concerns a new process for the isolation and purification of nucleic acids on hydrophobic surfaces, using hydrophobic membranes or membranes whose surfaces have been made hydrophobic.

The isolation and purification of nucleic acids from biological and clinical sample material is of crucial importance for fields of work in which operating techniques based on nucleic acids are employed, or in which technologies based on nucleic acids are actually the key to access. Examples include paternity analysis, tissue classification, identification of hereditary diseases, genome analysis, molecular diagnostics, determination of infectious diseases, animal and plant breeding, transgenic research, basic research in biology and medicine, as well as numerous related areas. In general, a difficulty is encountered in preparing biological or clinical sample materials in such a manner that the nucleic acids contained in them can be used directly in the analytic procedure in question.

The state of the art already includes many processes for the purification of DNA. For example, we know how to purify plasmid DNA for the purpose of cloning - and other experimental processes as well - according to the method of Birnboim [Methods in Enzymology 100 (1983) 243]. In this process, a cleared lysate of bacterial origin is exposed to a cesium chloride gradient and centrifuged for a period of 4 to 24 hours. This step is usually followed by the extraction and precipitation of the DNA. This process is associated with the disadvantage that it is very apparatus-intensive and, on the other hand, it takes a great deal of time, is cost-intensive and cannot be automated.

Other techniques in which cleared lysates are used to isolate DNA are based on ion-exchange chromatography [Colpan et al., J. Chromatog. 296 (1984) 339] and gel filtration [Moreau et al., Analyt. Biochem. 166 (1987) 188]. These processes are offered primarily as alternatives to the cesium chloride gradients, but these require a very apparatus-intensive solvent supply system and a precipitation of the DNA fractions is necessary, since these usually contain salts in high concentrations and are extremely diluted solutions.

Marko et al. [Analyt. Biochem., 121 (1982) 382] and Vogelstein et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615] have found that if the DNA from extracts containing nucleic acids is exposed to high concentrations of sodium iodide or sodium perchlorate, only DNA will adhere to glass scintillation tubes, fiberglass membranes or fiberglass sheets that have been finely ground by mechanical means, while RNA and proteins do not. The DNA that has been bound in this manner can be eluted, for

example, with water.

In the various teachings included in the state of the art, it is also generally stated that all processes for the purification of nucleic acids that are based on the principle of solid-phase extraction have recourse to the use of hydrophilic surfaces - such as modified silica materials - (for example, DEAE anionic-exchange chromatography, silica membranes or silica particles).

In the state of the art, it is generally noted that the surfaces must definitely exhibit a hydrophilic character - as exists, for example, in the case of silica gel - if these are to be suitable for the immobilization of nucleic acids. On the other hand, there is only one reference in the state of the art to the use of hydrophobic surfaces.

For example, in WO-A-87/06621, the immobilization of nucleic acids on a PVDF membrane is described. However, the nucleic acids bound to the PVDF membrane are not eluted in the next step; instead the membrane, together with all the bound nucleic acids is transferred directly into a PCR reaction. Finally, in this international patent application and in the other literature, it is stated that hydrophobic surfaces or membranes must in general be wetted beforehand with water or alcohol, in order to be able to immobilize the nucleic acids with yields that are somewhat satisfactory.

On the other hand, for a number of modern applications - such as, for example, the PCR, reversed transcription PCR, SunRise, LCX-branched-DNA, NASBA, or TaqMan technologies and similar real-time quantification techniques for PCR, it is absolutely necessary to be able to release the nucleic acids directly from the solid phase. In this connection, WO-A-87/06621 teaches us that, while the nucleic acids can indeed be recovered from the membranes used in the process, this recovery is fraught with problems and is far from suited to the quantitative isolation of nucleic acids. In addition, the nucleic acids obtained in this manner are, comparatively, extremely dilute - a circumstance that makes subsequent isolation and concentration steps absolutely necessary.

For the reasons stated above, the processes known from the state of the art do not constitute - particularly with regard to automation of the process for obtaining nucleic acids - a suitable starting point for an isolation of nucleic acid that is as simple and quantitative as possible from the point of view of process engineering.

The purpose of this invention is therefore to overcome the disadvantages of the processes known from the state of the art for the isolation of nucleic acids and to provide a process which is capable of being almost completely automated without substantial additional technical expenditure.

Another purpose of this invention is, in particular, to bind nucleic acids to an immobile phase - especially to a membrane - in such a manner that in a subsequent reaction step they can be released immediately from this phase and, if desired, used in other applications, such as, for example, restrictive digestion, RT, PACR, RT-PCR or NASBA, as well any other suitable analytic or enzymatic reaction named above.

These purposes are accomplished according to the invention through the use of porous hydrophobic membranes, to which the nucleic acids from the sample containing them can be bound in a simple manner and then be released in an equally simple process, with the simple procedure dictated by the invention making it possible, in particular, to fully automate the process.

According to this invention, a sample containing nucleic acids is defined as a sample or a sample preparation that contains nucleic acids which can serve as suitable educts for *in vitro* transcriptions, PCR reactions, NASBA reactions or cDNA syntheses of, for example, plasma, body fluids - such as blood, sputum, urine, feces - cells, serum, smears, tissue samples of every kind, plants and parts of plants, bacteria, viruses, yeasts, etc., as, for example, disclosed in European Patent Application No. 95909684.3, to whose content reference is hereby made, or also free nucleic acids.

In the process according to the invention, the sample containing nucleic acids described above is placed in a solution which contains suitable salts or alcohol(s), then, if necessary, renders the preparation soluble and mixes it, and the mixture so obtained is conducted through a hydrophobic membrane by means of a vacuum, through centrifuging, or by positive pressure, capillary force or any other suitable procedure.

Suitable salts for the immobilization of nucleic acids on hydrophobic membranes include salts of the alkaline or alkaline earth metals with mineral acids, in particular alkaline or alkaline-earth halogenides or sulfates, with the halogenides of sodium or potassium or magnesium sulfate being especially preferred.

Also suited for the conduct of the process according to the invention are salts of mono- or polybasic acids or polyfunctional organic acids with alkaline or alkaline-earth metals. These include, in particular, salts of sodium, potassium or magnesium with organic dicarboxylic acids - such as oxalic, malonic or succinic acid - or with hydroxy- or polyhydroxycarboxylic acids - for example, preferably, with citric acids.

The use of so-called chaotropic agents has proved to be especially effective. Chaotropic substances are capable of disturbing the three-dimensional structure of hydrogen bonds. As is generally known, this process also weakens the intramolecular binding forces that participate in forming the spatial structures - including primary, secondary, tertiary or quaternary structures - in biological molecules. Chaotropic agents of this kind are known to the expert from the state of the art (Rompp, Lexikon of Biotechnologie, published by H. Dellweg, R.D. Schmid and W.E. Fromm, Thieme Verlag, Stuttgart 1992).

The preferred chaotropic substances for use with this invention are, for example, salts from the trichloroacetate, thiocyanate, perchlorate or iodide group or from guanidine hydrochloride and urea.

The chaotropic substances are used in a 0.01- to 10-molar aqueous solution, preferably in a 0.1- to



7-molar aqueous solution and most preferably in a 0.2- to 5-molar aqueous solution. The chaotropic agents mentioned above can be used alone or in combinations. In particular, a 0.01- to 10-molar aqueous solution, preferably a 0.1- to 7-molar aqueous solution and most preferably a 0.2- to 5-molar aqueous solution of sodium perchlorate, guanidinium hydrochloride, guanidinium-iso-thiocyanate, sodium iodide or potassium iodide.

The suitable alcohols for the conduct of the process according to the invention include, first of all, all the hydroxyl derivatives of aliphatic or acyclic saturated or unsaturated hydrocarbons. It is initially unimportant whether the compound in question contains one-, two, three or more hydroxyl groups - such as polyvalent C1-C5 alkanols, including ethylene glycol, propylene glycol or glycerine.

In addition, the alcohols that can be used in the invention include the sugar derivatives - the so-called aldites - as well as the phenols, such as polyphenols.

Among the hydroxyl compounds mentioned above, the C1-C5 alkanols, such as methanol, ethanol, n-propanol, tertiary butanol and the pentanols are especially preferred.

Hydrophobic materials for purposes of this invention are those materials or membranes that, due to their chemical character do not penetrate water - or vice versa - cannot remain in it.

For purposes of this invention, a hydrophobic surface - preferably a membrane - is understood to be any microporous dividing layer that displays a hydrophobic character. In the case of a membrane, the hydrophobic surface consists of a film made from a polymer material, preferably containing polar groups, such as ester, carbonyl or amide groups. As an alternative, it is conceivable to mount the polar group on a surface when the hydrophobic coating agent is transferred to it, even if the surface itself has no polar groups, if this is desired.

In another embodiment of the process according to the invention, the concept of "surface" in the broader sense includes a layer of particles or a granulate or even fibers with hydrophobic characteristics, which consist of the materials originally forming the membranes.

Membranes preferred for the purposes of this invention are those consisting of a hydrophilic basic material and which are made hydrophobic by an appropriate chemical post-treatment, known from the state of the art, such as, for example, hydrophobized nylon membranes that can be obtained commercially.

For the purposes of this invention, hydrophobized membranes include, in general, those membranes which may or may not have been hydrophilic to begin with and are coated with the hydrophobized agents mentioned below. Hydrophilic coating agents of this kind cover hydrophilic substances with a thin layer of hydrophobic groups, such as fairly long alkyl chains or siloxane groups. Suitable hydrophobic coating agents are known in great number from the state of the art;

for purposes of the invention, these include paraffins, waxes, metallic soaps etc., if necessary with additives of aluminum or zirconium salts, quarternary organic compounds, urea derivatives, lipid-modified melamine resins, silicones, zinc-organic compounds, glutaric dialdehyde and similar compounds.

In addition, the hydrophobic membranes that can be used for purposes of the invention are those that have been hydrophobized and whose basic material contains polar groups. According to these criteria, for example, materials from the following groups - particularly hydrophobized ones - are suitable for use with the invention.

Nylon, polysulfones, polyether sulfones, polycarbonates, polyacrylates and acrylic acid copolymers, polyurethanes, polyamids, polyvinylchlorides, fluorocarbonates, polytetrafluoroethylene, polyvinylene difluoride, ethylene tetrafluoroethylene, polyethylene-chlorotrifluoroethylene copolymerisate or polyphenylene sulfide, and cellulose-mix esters or nitrocelluloses as well as hydrophobized optical fiber membranes, with hydrophobized nylon membranes being especially preferred.

The membranes that are used in the process according to the invention have, for example, a pore diameter of 0.05 to 20  $\mu\text{m}$ , preferably 0.2 to [omission]  $\mu\text{m}$  and most preferably 0.45 to 5.0  $\mu\text{m}$ .

For washing buffers, the salts or alcohols, phenols or polyphenols, described above can be used. The temperatures in the washing step will usually be within the range from 10 to 30° C; higher temperatures can also be used successfully.

Suitable eluting agents for the purposes of the invention are water or aqueous salt solutions. As salt solutions, buffer solutions that are known from the state of the art are used, such as morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazino] ethane sulfonic acid (HEPES) in a concentration from 0.001 to 0.5 moles/liter, preferably 0.01 to 0.2 moles/liter, most preferably 0.01 to 0.05 molar solutions. Also preferred for use are aqueous solutions of alkaline or alkaline-earth metal salts - in particular, their halogenides - including 0.001 to 0.5 - preferably 0.01 to 0.2 molar, most preferably 0.01 to 0.05 molar - aqueous solutions of sodium chloride, lithium chloride, potassium chloride or magnesium chloride. Also preferred for use are solutions of salts of the alkaline or alkaline-earth metals with carboxylic or dicarboxylic acids - oxalic acid or acetic acid - in the range of concentrations mentioned above - for example, 0.001 to 0.5 - preferably 0.01 to 0.2 molar, most preferably 0.01 to 0.05 molar solutions of sodium acetate or oxalate in water.

Water is by far the best eluting agent.

The elution for purposes of the invention can be accomplished by positive pressure, vacuum, centrifuging or capillary forces.

With regard to the individual steps, the process according to the invention can be performed as follows:

The lysate of the sample used for the recovery of the nucleic acids or the originally free nucleic acid(s) is/are pipetted, for example, in a (plastic) column, in which the hydrophobic membrane is fastened - for example, on the floor. It is more efficient if the membrane is fastened to a grid, which serves as a mechanical support. The lysate is then conducted through the membrane, which can be achieved by applying a vacuum at the outlet of the column. The transport can also be accomplished by applying positive pressure to the lysate. In addition - as mentioned above - the transport of the lysate can take place by centrifuging or by the effect of capillary forces. The latter can be produced, for example, with a sponge-like material which is introduced below the membrane, in contact with the lysate or filtrate.

The advantage of such an arrangement consists of a simple, reliable and handy possibility for disposing of the filtrate - in this case, only the sponge, which is now more or less saturated with the filtrate, need be exchanged. It should be clear at this point that the column can be operated continuously or batch-wise and that both these modes of operation can be fully automated, until the hydrophobic membrane is completely saturated with nucleic acid. The final step is the elution of the nucleic acid, which can, for example, be pipetted or lifted from the membrane or suctioned, pressured or centrifuged through the abovementioned layer of particles, granulate or fibers made of hydrophobic membrane materials.

The capture of fractions that contain the desired nucleic acids in highly diluted solutions and require a subsequent concentration becomes completely unnecessary with the process according to the invention; instead, the desired nucleic acids are obtained in solutions containing little or no salt in very small volumes, which is of great advantage for all molecular biological analytic procedures, since these demand pure nucleic acids in the smallest possible volumes with a simultaneously high concentration.

The final process step - as well as the preparation of the membrane or column according to the invention for the subsequent isolation of the nucleic acid - can easily be fully automated, since the nucleic acids that have been completely eluted can be easily removed from the membrane from the top by vacuum or pipetting.

This invention also offers the advantage that the space above the membrane can be used as a reaction chamber. Thus, for example, it is possible, after the nucleic acid obtained by means of the process according to the invention has been isolated and eluted, to subject it to a molecular biological application - such as restrictive digestion, RT, PCR, RT-PCR, NASBA or enzyme reactions, to bind the nucleic acids produced from these reactions again to the hydrophobized membrane, to wash them and then to eluate them, isolate them or analyze them - for example, by spectroscopy, fluorometry or similar measuring processes by means of the process according to the invention.

The invention described above is illustrated in the following examples. Various other embodiments of the process will be obvious to the expert from the preceding description and the examples. It is, however, expressly stated that these examples and the description that accompanies them are intended solely for the purpose of illustration and are not to be regarded as a limitation of the scope of the invention.

### Example 1

#### Isolation of total RNA from HeLa cells

Commercially available nylon membranes (for example, a material from MSI: Magna SH with a pore diameter of 1.2  $\mu\text{m}$  or a material from Pall GmbH: Hydrolon with a pore diameter of 1.2  $\mu\text{m}$ ) which have been made hydrophobic by means of a chemical post-treatment are placed in a plastic column. The membranes are placed on a polypropylene grid which serves as a mechanical support. The membranes are fixed in the plastic column with a ring.

The column prepared in this manner is connected by means of a Luer connection to a vacuum chamber. All the isolation steps are conducted through the application of a vacuum.

For the isolation,  $5 \times 10^5$  HeLa cells are pelletized by centrifugation. The cells are lysated by the addition of 150  $\mu\text{l}$  of a commercial guanidium isothiocyanate buffer - for example RLT buffer from QIAGEN - in a manner thoroughly familiar from the state of the art. Lysis is promoted by roughly mixing by pipetting or vortexing over a period of about 5 s. Then 150  $\mu\text{l}$  of 70% ethanol are added and mixed in by pipetting or by vortexing over a period of about 5 s.

The lysate is then pipetted into the plastic column and suctioned through the membrane by evacuating the vacuum chamber. Under the conditions thus created, the RNA remains bound to the membrane. Next, washing takes place with a first commercial washing buffer containing guanidium isothiocyanate - for example, with the RW1 buffer of QIAGEN - and, after that, with a second washing buffer containing TRIS or TRIS and alcohol - for example, with the RPE buffer of QIAGEN. The washing buffers in each case are suctioned through the membrane by evacuation of the vacuum chamber. After the final washing step, the vacuum is maintained for a period of about 10-min, in order to dry the membrane, after which the vacuum chamber is switched off.

For the elution, 70  $\mu\text{l}$  RNase-free water is pipetted onto the membrane in order to release the purified RNA from the membrane. After incubation for one minute at a temperature in the range from 10 to 30° C, the eluate is pipetted from the membrane from the top and the elution step is repeated in order to make sure that the elution is complete.

The volume of isolated total RNA obtained in this manner is then determined by spectrophotometric measurement of the light absorption with a wavelength of 260 nm. The ratio between the absorbance

values at 260 and 280 nm gives an estimate of RNA purity (see Fig. 1: Total RNA (isolated by Hydrolon 1.2)).

The results of the two isolations with hydrophobic nylon membranes (Nos. 1 and 2) are shown in Table 1, compared with experiments in which for [omission] a hydrophilic nylon (Nyaflo) (No. 3) and a silica membrane were used. The values reported in the table provide convincing support for the impressive isolation yield and separation effect of the hydrophobic materials used in accordance with the invention.

Table 1. RNA yield and purity of the total RNA isolated in accordance with Example 1

No.	Type of membrane	Yield of Total RNA ( $\mu\text{g}$ )	E260/E280
1	Magna SH 1.2 $\mu\text{m}$ (hydrophobic nylon)	6.0	1.97
2	Hydrolon 1.2 $\mu\text{m}$ (hydrophobic nylon)	7.1	2.05
3	Nyaflo (hydrophilic nylon)	<0.2	Not determined
4	Hydrophilic silica membrane	<0.2	Not determined

The isolated RNA can also be analyzed on agarose gels that have been stained with ethidium bromide. For this purpose, for example, 1.2% formaldehyde agarose gels are assembled. The result is shown in Figure 2.

In Figure 2, Lane 1 is a total RNA that was isolated by means of a hydrophobic nylon membrane from Magna SH with a pore diameter of 1.2 $\mu\text{m}$ .

Lane 2 is a total RNA that was isolated by means of a hydrophobic nylon membrane from Hydrolon with a pore diameter of 1.2 $\mu\text{m}$ .

Lane 3 represents the chromatogram of a total RNA that was isolated by means of a silica membrane.

In each case, 50  $\mu\text{l}$  of the total RNA isolate was analyzed.

Fig. 2 provides convincing evidence that when a silica membrane is used, no measurable proportion of the total RNA can be isolated.

#### Example 2

## Isolation of total RNA from mouse liver

In this example, the lysate and washing solutions are conducted through the hydrophobic membrane by centrifugation, and the RNA is eluted by removing the residue from the top.

5 mg of mouse liver, deep-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  are placed in a 2 ml reaction apparatus loaded with 350  $\mu\text{l}$  of a commercially available lysis buffer containing guanidium isothiocyanate (for example, RLT buffer from QIAGEN and homogenized by means of an electric homogenizer for a period of 30 seconds. Next, 350  $\mu\text{l}$  of 70% ethanol are added to the lysate and mixed for a period of 5 seconds by pipetting or by vortexing. Three lysates of this kind are then each transferred into a plastic column containing a 1.2  $\mu\text{m}$  Magna SH hydrophobic nylon membrane, a hydrophobic Hydrolon membrane and - for purposes of comparison - optical-fiber membranes of hydrophilic silica, which are placed in a 2 ml receptacle. The lysate is in each case conducted through the membrane by centrifugation for a period of 15 s at  $10,000 \times g$ , and the RNA is left adhering to the membranes according to the values shown in Table 2.

The flowthrough product is thrown away in each case, and the column is again placed in the receptacle. The membranes are then washed once with a commercially available washing buffer (for example, the RW1 buffer from QIAGEN) and twice with another commercially available washing buffer containing guanidium isothiocyanate (for example, the RPE buffer from QIAGEN), with the washing buffer being conducted through the membranes in each case by centrifugation and the last washing step taking place at  $18,000 \times g$  for a centrifugation time of 2 minutes, in order to dry the membrane.

For the elution, 70  $\mu\text{l}$  of RNase-free water is transferred onto the membrane, in order to release the purified RNA from it. After incubation for a period of one minute at  $10 - 30^{\circ}\text{C}$ , the eluates are removed from the top - that is, from the residue on the membrane - by means of a pipette. The elution step is then repeated once again.

The volume of isolated total RNA is determined by spectrophotometric measurement of the light absorption at 260 nm. The ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm gives an estimate of RNA purity.

Table 2. RNA yield and purity of the total RNA isolated in accordance with Example 2

No.	Type of membrane	Yield of Total RNA ( $\mu\text{g}$ )	E260/E280
1	Magna SH 1.2 $\mu\text{m}$ (hydrophobic nylon)	15	1.92
2	Hydrolon 1.2 $\mu\text{m}$ (hydrophobic nylon)	14	2.05

3	Glass fiber membrane (Hydrophilic silica)	1.7	Not determined
---	---	-----	----------------

### Example 3

Isolation of free RNA by binding the RNA to hydrophobic membranes by means of various salt-alcohol mixtures. In this example, the lysate and washing solutions are conducted through the hydrophobic membrane by applying a vacuum.

Hydrophobic nylon membranes (for example, 1.2 mm Hydrolon from the Pall Company) are introduced into plastic columns that are connected to a vacuum chamber, in a manner similar to that of Example 1.

100  $\mu$ l of an aqueous solution containing total RNA is mixed, by pipetting, with, respectively, 350 $\mu$ l of a commercially available lysis buffer containing guanidium isothiocyanate (for example, the RLT buffer from QIAGEN), 350  $\mu$ l of 1.2 M sodium acetate solution, 350  $\mu$ l 2 M sodium chloride solution and 350  $\mu$ l of 4 M lithium chloride solution, respectively, and mixed by pipetting.

Next, 250  $\mu$ l of ethanol is added to each mixture and mixed in, likewise by pipetting. After that, the solutions containing RNA are transferred into the plastic columns and suctioned through the membrane by evacuating the vacuum chamber. Under the conditions described, the RNA remains bound to the membranes. The membranes are then washed, as described in Example 1.

Finally, the RNA - also as described in Example 1 - is removed from the membrane by pipetting from the top.

The volume of isolated total RNA is determined by spectrophotometric measurement of the light absorption at 260 nm. The ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm gives an estimate of RNA purity.

Table 3. Isolation of free RNA by binding the RNA to hydrophobic membranes by means of various salt-alcohol mixtures

No.	Salt-alcohol mixture	Yield of Total RNA ( $\mu$ g)	E260/E280
1	Qiagen RLT buffer	9.5	1.92
2	0.6 M sodium acetate / 35% ethanol	8.5	1.98
3	1.0 M sodium chloride / 35% ethanol	7.9	1.90

4	2 M lithium chloride /35% ethanol	4.0	2.01
---	-----------------------------------	-----	------



## Patent Claims

1. Process for the isolation of nucleic acids on hydrophobic surfaces, characterized by the fact that it includes the following steps:

- immobilization of the nucleic acids on a hydrophobic surface
- if desired, washing of the immobilized nucleic acids with a washing buffer
- release of the immobilized nucleic acids from the surface
- if desired, elution.

2. Process according to Claim 1, characterized by the fact that the hydrophobic surface is a membrane.

3. Process according to Claim 2, characterized by the fact that the hydrophobic membrane is made of a polymer with polar groups.

4. Process according to Claims 1 to 3, characterized by the fact that aqueous solutions of salts of the alkaline or alkaline-earth metals with mineral acids are used to immobilize the nucleic acids.

5. Process according to Claim 4, characterized by the fact that alkaline or alkaline-earth halogenides or sulfates are used to immobilize the nucleic acids.

6. Process according to Claim 5, characterized by the fact that halogenides of sodium or potassium or magnesium sulfate are used to immobilize the nucleic acids.

7. Process according to Claims 1 to 3, characterized by the fact that aqueous solutions of salts of mono- or polybasic or polyfunctional organic acids with alkaline or alkaline-earth metals are used to immobilize the nucleic acids.

8. Process according to Claim 7, characterized by the fact that aqueous solutions of salts of sodium, potassium or magnesium with organic dicarboxylic acids are used to immobilize the nucleic acids.

9. Process according to Claim 8, characterized by the fact that the organic dicarboxylic acids are oxalic acid, malonic acid or succinic acid.

10. Process according to Claim 7 characterized by the fact that aqueous solutions of salts of sodium or potassium with a hydroxy- or polyhydroxycarboxylic acid are used to immobilize the nucleic acids.

11. Process according to Claim 10, characterized by the fact that the polyhydroxycarboxylic acid is citric acid.
12. Process according to Claims 1 to 3, characterized by the fact that, if desired, additional chaotropic agents are used to immobilize the nucleic acids.
13. Process according to Claim 12, characterized by the fact that the chaotropic agent is a salt from the group of trichloroacetates, thiocyanates, perchlorates iodides or guanidine hydrochloride, guanidine isothiocyanate or urea.
14. Process according to Claim 12 or 13, characterized by the fact that 0.01 molar to 10 molar aqueous solutions of the chaotropic agents are used, alone or in combination with other salts, to immobilize the nucleic acids.
15. Process according to Claim 14, characterized by the fact that 0.1 molar to 7 molar aqueous solutions of the chaotropic agents are used, alone or in combination with other salts, to immobilize the nucleic acids.
16. Process according to Claim 15, characterized by the fact that 0.2 molar to 5 molar aqueous solutions of the chaotropic agents are used, alone or in combination with other salts, to immobilize the nucleic acids.
17. Process according to any of Claims 12 to 16, characterized by the fact that an aqueous solution of sodium perchlorate, guanidium hydrochloride, guanidium isothiocyanate, sodium iodide or potassium iodide is used to immobilize the nucleic acids.
18. Process according to Claims 1 - 3, characterized by the fact that hydroxyl derivatives of aliphatic or acyclic saturated or unsaturated hydrocarbons are used to immobilize the nucleic acids.
19. Process according to Claim 18, characterized by the fact that C1-C5 alkanols are used as the hydroxyl derivatives.
20. Process according to Claim 19, characterized by the fact that methanol, ethanol, n-propanol, tertiary butanol or pentanols are used as the C1-C5 alkanols.
21. Process according to Claim 18, characterized by the fact that an aldite is used as the hydroxyl derivative.
22. Process according to any of Claims 1 to 3, characterized by the fact that a phenol or polyphenol is used to immobilize the nucleic acids.
23. Process according to Claims 1 to 3, characterized by the fact that hydrophilic membranes with

a hydrophobized surface are used to immobilize the nucleic acids.

24. Process according to any of Claims 1, 3 or 23, characterized by the fact that the hydrophilic surface or the membrane is made of nylon, a polysulfon, polyether sulfon, polycarbonate, polyacrylate, as well as an acrylic acid copolymer, polyurethane, polyamid,

25. Process according to Claim 24, characterized by the fact that the surface or membrane consists of hydrophobized nylon.

26. Process according to any of Claims 23 - 25, characterized by the fact that the membrane is coated with a hydrophobic coating agent from the group of paraffins, waxes, metallic soaps, if desired with the addition of aluminum or zirconium salts, quaternary organic compounds, urea derivatives, lipid-modified melamine resins, silicones or zinc-organic compounds or with glutaric dialdehyde.

27. Process according to Claims 1 - 3, characterized by the fact that a salt solution or a buffer solution according to any of Claims 4 - 22 is used to wash the immobilized nucleic acids.

28. Process according to Claims 1 - 3, characterized by the fact that an aqueous salt or buffer solution is used for the elution of the nucleic acids.

29. Process according to Claim 28, characterized by the fact that the buffer solution contains one or more substances from the morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), TRIS(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS), 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin] ethane sulfonic acid (HEPES) groups.

30. Process according to Claim 28 or 29, characterized by the fact that the buffer substance is used in an aqueous solution with a concentration in the range from 0.001 to 0.5 mole/liter.

31. Process according to Claim 30, characterized by the fact that the buffer substance is used in an aqueous solution with a concentration in the range from 0.01 to 0.2 mole/liter.

32. Process according to Claim 31, characterized by the fact that the buffer substance is used in an aqueous solution with a concentration in the range from 0.01 to 0.05 mole/liter.

33. Process according to Claim 28, characterized by the fact that an aqueous solution of an alkaline or alkaline-earth metal halogenide is used as the salt solution.

34. Process according to Claim 33, characterized by the fact that an aqueous solution of sodium chloride, lithium chloride, potassium chloride or magnesium chloride is used as the salt solution.

35. Process according to Claim 33 or 34, characterized by the fact that the salt is used in the aqueous solution in a concentration ranging from 0.001 to 0.5 mole/liter.

36. Process according to Claim 35, characterized by the fact that the salt is used in the aqueous solution in a concentration ranging from 0.01 to 0.2 mole/liter.
37. Process according to Claim 36, characterized by the fact that the salt in the aqueous solution is used in a concentration ranging from 0.01 to 0.05 mole/liter.
38. Process according to Claim 28, characterized by the fact that an aqueous solution of a salt of an alkaline or alkaline-earth metal with a carboxylic or dicarboxylic acid is used as the salt solution.
39. Process according to Claim 38, characterized by the fact that the carboxylic acid is acetic acid and the dicarboxylic acid is oxalic acid..
40. Process according to Claim 39, characterized by the fact that the salt is sodium acetate or sodium oxalate.
41. Process according to any of Claims 38, 39 or 40, characterized by the fact that the salt is present in an aqueous solution in a concentration ranging from 0.001 to 0.5 mole/liter.
42. Process according to Claim 41, characterized by the fact that the salt is present in an aqueous solution in a concentration ranging from 0.01 to 0.2 mole/liter.
43. Process according to Claim 42, characterized by the fact that the salt is present in an aqueous solution in a concentration ranging from 0.01 to 0.05 mole/liter.
44. Process according to Claims 1 - 3, characterized by the fact that water is used as the elution agent.
45. Process according to Claims 1 - 44, characterized by the fact that the membrane has a pore diameter of 0.05 to 20 $\mu$ m, preferably 0.2 to [omission]  $\mu$ m, most preferably 0.45 to 5.0  $\mu$ m.
46. Use of a surface or a membrane made of material of a hydrophilic material whose surface has been made hydrophobic to isolate the nucleic acids.
47. Use according to Claim 46, characterized by the fact that the surface or membrane consists of nylon, polysulfone, polyether sulfone, polycarbonate, polyacrylate and acrylic acid copolymers, polyurethanes, polyamids, polyvinyl chloride, fluorocarbonates, polytetrafluoroethyl, polyvinylene difluoride, ethylene co-tetrafluoroethylene, polyethylene chlorodifluoroethylene copolymerisates or polyphenylene sulfide.
48. Use according to Claim 46, characterized by the fact that the membrane is a hydrophobized nylon membrane.
49. Use according to any of Claims 46 to 48, characterized by the fact that the surface or membrane

is a hydrophilic surface or membrane which has been covered with a hydrophobic coating agent from the group of paraffins, waxes, metallic soaps, if desired with the addition of aluminum or zirconium salts, quaternary organic compounds, urea derivatives, lipid-modified melamine resins, silicones or zinc-organic compounds or with glutaric dialdehyde.

50. Mechanism comprising a hydrophobic surface according to any of Claims 1 to 3, a solution to immobilize the nucleic acid, a washing solution and, if desired, an elution solution.

### Summary

This invention concerns a new process for the isolation and purification of nucleic acids, using hydrophobic surfaces and, in particular, hydrophobic membranes.